

マクロファージの機能制御における各種kinaseの役割に関する研究

著者	八巻 耕也
号	313
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/15581

氏 名 (本籍)	や 八	まき 巻	こう 耕	や 也
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)			
学 位 記 番 号	薬 博 第 3 1 3 号			
学位授与年月日	平 成 14 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研 究 科、専 攻	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 医療薬科学専攻			
学 位 論 文 題 目	マクロファージの機能制御における各種kinaseの 役割に関する研究			
論文審査委員	(主 査) 教授 大 内 和 雄 教授 水 柿 道 直 教授 中 畑 則 道			

論文内容要旨

炎症は、局所あるいは全身に加わる炎症性刺激、すなわち細菌の侵入や体内異物に対する生体組織がおこす、発赤、腫脹、疼痛、発熱、組織傷害を伴う生体防御反応であり、炎症性刺激を排除し組織を修復するまでの一連の過程である。

血球細胞の中でマクロファージは、傷口や粘膜などから組織に侵入した細菌や体内において発生したがん細胞を貪食処理し、その抗原情報をTリンパ球に提示し、さらには各種炎症性メディエーターを産生し、炎症反応や免疫反応の成立に中心的な役割を果たす。

自己免疫疾患である慢性関節リウマチにおいては、炎症局所におけるマクロファージなどの炎症性細胞の集積や、種々のメディエーターの産生量の増加が認められ、過度の炎症反応が誘発される結果、自己組織の損傷に伴う痛みや発熱がひきおこされる。さらには炎症局所で産生された種々のメディエーターが、炎症性細胞のさらなる集積、活性化および生存延長をひきおこし、慢性的な炎症反応を誘導し、破骨細胞の活性化やプロテアーゼの産生に伴う関節破壊などの機能障害をひきおこすと考えられている。

マクロファージの機能発現に関与する細胞内情報伝達分子を明らかにすることができれば、マクロファージの機能を医薬で調節することができる可能性があり、このような研究は炎症性疾患をはじめとする各種疾患の治療法を確立する上で、大きく貢献するものと思われる。

当研究室において、起炎作用を持つ staurosporine にはラット腹腔マクロファージに対して、血管透過性を亢進し発赤を誘導する作用を持つ炎症のケミカルメディエーターである prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生を亢進させる作用があることを明らかにした。しかし、この PGE₂ 産生亢進作用を含む炎症誘導作用が、いかなる細胞内情報伝達分子の働きによってひきおこされているのかについては明らかにされていない。そこで本研究では、ラット腹腔マクロファージを staurosporine で刺激することにより誘導される炎症のケミカルメディエーターである PGE₂ の産生や炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) の産生に、細胞内情報伝達に介在するリン酸化酵素がどのように関与するのか解析した。また、マクロファージは過度の炎症性刺激によりアポトーシスが誘導されることが知られているが、炎症性メディエーターの産生亢進を誘導する濃度よりも高濃度の staurosporine はマウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞のアポトーシスを誘導する作用があることを見いだしたので、staurosporine によるアポトーシスの誘導に対して細胞内情報伝達に介在するリン酸化酵素がどのように関与しているのかについて解析した。

まず、PGE₂ の産生経路に関与する酵素である cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) および cyclooxygenase-2 (COX-2) に注目して解析を行った。その結果、63 nM の濃度の staurosporine によるラット腹腔マクロファージの PGE₂ 産生亢進は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介する cPLA₂ の活性化による arachidonic acid 遊離亢進と、atypical protein kinase C (PKC) 経路を介する COX-2 タンパク質発現量の亢進が協調的に働くことによって行われることが示唆された。

次に、staurosporine はラット腹腔マクロファージに対して IL-6 mRNA レベルの上昇を介してインターロイキン-6 (IL-6) の産生を亢進させる作用があることを明らかにした。また、staurosporine のラット腹腔

マクロファージに対する IL-6 産生亢進および IL-6 mRNA レベルの上昇作用は、staurosporine の濃度が 6.3 nM から 63 nM までは濃度依存的に増加したが、210 nM にするとその作用は減弱することが明らかになった。一方、staurosporine 誘導体である K-252a や KT-5720 にはそのような作用は認められなかった。さらに各種 kinase 阻害薬を用いた検討により、staurosporine によるラット腹腔マクロファージの IL-6 産生は PKC および PI3K の活性化により亢進され、protein tyrosine kinase (PTK) の活性化により抑制されること、また protein kinase A (PKA) の活性化によつては影響を受けないことが示唆された。

一方、これら炎症性メディエーターの産生を亢進する濃度より高い濃度である $2.1 \mu\text{M}$ 濃度の staurosporine は RAW264.7 細胞の細胞死を誘導することが明らかになった。この staurosporine による RAW264.7 細胞の細胞死においては、DNA の断片化、phosphatidylserine の細胞外への露出の増加および caspase の活性化に伴う poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) の切断が検出されたことから、staurosporine は RAW264.7 細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。また staurosporine 存在下で RAW264.7 細胞を培養すると p44/42 MAPK のリン酸化レベルは経時的に低下し、逆に p38 MAPK のリン酸化レベルが上昇することが明らかになったため、これらの kinase を含む各種細胞内情報伝達に参与するリン酸化酵素のアポトーシスにおける役割について解析した。Staurosporine による RAW 264.7 細胞の DNA の断片化および PARP の切断は p44/42 MAPK 阻害薬、p38 MAPK 阻害薬および PI3K 阻害薬の共存によって増強されたことから、p44/42 MAPK、p38 MAPK および PI3K は caspase の活性化を抑制することによりアポトーシスに対して抑制的に作用していることが示唆された。また PKA 阻害薬は PARP の切断には影響を与えずに DNA の断片化のみを増強したことから、PKA は caspase の活性には影響を与えずにアポトーシスに対して抑制的に作用していることが示唆された。一方、PKC 阻害薬により DNA の断片化および PARP の切断が抑制されたことから、PKC は caspase の活性化を促進することにより、アポトーシスを促進させることが示唆された。また、PKC 阻害薬によるアポトーシスの抑制機序には、PKC の阻害による p38 MAPK の活性化が関与していることも示唆された。

また、今回の結果とこれまでの報告から、staurosporine などの刺激により活性化される細胞内情報伝達に参与するリン酸化酵素による炎症反応においては、次のことが考えられる。

PKC はマクロファージの PGE_2 および IL-6 の産生を亢進させ、アポトーシスの進行も促進させることから、マクロファージの反応を全体的に亢進させる作用があると考えられる。このことから PKC を阻害することによって、マクロファージの全体的な機能発現を抑制させることができると思われる。すなわち炎症局所のマクロファージの PKC を阻害することにより、アポトーシスによる細胞数の減少を抑制しつつ、炎症性メディエーターの産生を抑制できる可能性がある。PKC を阻害することは、マクロファージの数の減少を伴わないため、PKC の阻害を解除すれば、比較的早く正常の細胞機能が回復すると思われ、マクロファージが多量の炎症性メディエーターを産生して病態を悪化させている場合に PKC を阻害することは炎症反応を軽減させるために有用であると思われる。また、当研究室において、staurosporine による COX-2 mRNA レベルの上昇および PKC 活性化薬 TPA による COX-2 mRNA レベルの上昇は共に PKC の阻害によって抑制されることを明らかにしている。これらのことから、PKC は様々な刺激による炎症性

メディエーターの産生を抑制するためのターゲット分子として重要であると思われる。

一方、PI3K, p44/42 MAPK および p38 MAPK の活性化は、PGE₂ および IL-6 などの産生を亢進させる作用を持つ点で PKC と同様の役割を担っているが、アポトーシスの進行に対しては抑制する方向で作用する。これらのことから、PI3K, p44/42 MAPK および p38 MAPK の阻害により、マクロファージのアポトーシス促進と炎症性メディエーター産生の抑制という2つの作用機序から抗炎症作用が期待できる。したがって、これらの kinase を抑制することは、炎症局所に過剰な数のマクロファージが浸潤し炎症を増悪している場合に有用な手段になると思われる。

今回の研究では staurosporine の直接のターゲット分子の同定には至らなかったが、少なくともそのターゲットの一つは PI3K と PKC の上流に存在することが示唆された。このターゲットを探索することにより、マクロファージの機能発現に重要な新たな細胞内情報伝達経路が明らかになるものと思われ、さらに詳細に解析していく必要がある。

審査結果の要旨

本研究は、炎症細胞であるマクロファージの prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生および interleukin-6 (IL-6) 産生、ならびに apoptosis に関与する各種 kinase の役割について明らかにすることを目的として、起炎作用のある staurosporine を刺激薬として用いて解析を行った。

まず、ラット腹腔マクロファージを staurosporine で刺激した場合の PGE₂ 産生亢進に関与する細胞内分子について解析し、その産生亢進には、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - p 44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) - cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) 経路の活性化による arachidonic acid 遊離亢進と atypical protein kinase C (aPKC) の活性化による cyclooxygenase-2 発現亢進が関与していることを示した。

次に、staurosporine にはラット腹腔マクロファージに対して IL-6 の産生を亢進させる作用があることを明らかにし、また、その産生亢進作用においては PKC および PI3K の活性化が重要な役割を果たしていること、一方、protein tyrosine kinase (PTK) の活性化は IL-6 産生に抑制的に作用していること、さらに、protein kinase A (PKA) の活性化は IL-6 産生に影響を及ぼさないことを示した。

最後に、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に対する staurosporine の apoptosis の誘導について解析し、その誘導は DNA の断片化、膜構造の変化、および caspase の活性化を伴うことを明らかにした。また、staurosporine による apoptosis の誘導に対して PI3K, p44/42 MAPK, p38 MAPK および PKA は抑制的に作用していること、一方、PKC は促進的に作用していることを示した。さらに、PKC は p38 MAPK 活性化を抑制することによって、apoptosis に対して促進的に作用している可能性を示した。

これらの結果から、staurosporine による起炎作用の一部には、マクロファージによる炎症性ケミカルメディエーターである PGE₂ の産生亢進および炎症性サイトカインである IL-6 産生亢進が関与していること、およびそれらの産生には、PKC, PI3K, および p44/42 MAPK が重要であることを示すとともに、staurosporine によるマクロファージの apoptosis の誘導においては、PKC は促進的に作用し、PI3K, p44/42 MAPK, p38 MAPK および PKA は抑制的に作用することを示し、これらの細胞内情報伝達分子が抗炎症戦略のターゲット分子となり得ることを示唆した。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。